



TITLE:

超解像顕微鏡法と1分子イメージング法による細胞膜近傍アクチン結節構造とその機能の研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

柴田, 祐希

CITATION:

柴田, 祐希. 超解像顕微鏡法と1分子イメージング法による細胞膜近傍アクチン結節構造とその機能の研究. 京都大学, 2018, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13175>

RIGHT:

許諾条件により要旨は2018-03-31に公開; ortical actin nodes: Their dynamics and recruitment of podosomal proteins as revealed by super-resolution and single molecule microscopy" YUKI M. SHIRAI, TAKA A. TSUNOYAMA, NAO HIRAMOTO-YAMAKI, KOICHIRO M. HIROSAWA, AKIHIRO C.E. SHIBATA, KENICHI KONDO, ATSUSHI TSURUMUNE, FUMIYOSHI ISHIDATE, AKIHIRO KUSUMI, TAKAHIRO K. FUJIWARA ("PLOS ONE" November 2017, e0188778). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188778>

京都大学	博士（工学）	氏名	柴田 祐希
論文題目	超解像顕微鏡法と1分子イメージング法による細胞膜近傍アクチン結節構造とその機能の研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、生細胞の細胞膜近傍アクチン構造を超解像蛍光顕微鏡法により観察し、アクチン線維が結節されたようなクラスター構造を発見したことに基づいて研究を発展させ、結節クラスター構造の動態、駆動機構、細胞内での局在と機能を明らかにする研究について纏めたものであり、6章から構成されている。</p> <p>第1章は緒論であり、研究の背景である。細胞膜近傍のアクチン構造が関わる細胞現象とその計測方法について概説し、本研究の目的、論文全体の構成について述べている。</p> <p>第2章では、アクチン線維が結節されたようなクラスター構造を発見したことに基づいて研究を発展させ、クラスター構造を観察する方法として、プローブ用酵素であるファロイジンとLifeactの両方で、固定細胞において、クラスター構造を観察したことを述べ、このクラスター構造を「アクチン p1 クラスター」と名付けた。そして、生きている細胞において、アクチン p1 クラスターの超解像観察を行い、挙動を分析した。まず、アクチン p1 クラスターの動きを、おおまかに6種類に分類し、次に、アクチン p1 クラスターの細胞膜からの距離を、全反射顕微鏡を用いて調べた。その結果、91%が細胞膜から 100 nm 以内にあることを明らかにした。その後、アクチン p1 クラスターがランダム運動と一方向性の運動が混じり合った運動を行い、その運動は、アクチン網の多数の部位で、ミオシン II モーター分子がアクチン線維を引っ張っていることに起因することを示した。また、アクチンのクラスター構造についての他グループによる先行研究である actin node/aster との相違点を示した。</p> <p>第3章では、第2章で明らかになった、アクチン p1 クラスターの細胞膜からの距離をさらに詳細に調べることを目的として、新たに細胞膜貫通型のアクチン結合プローブであるLifeact-TMを開発した。次に、Lifeact-TMの作製方法と、細胞膜からの距離の計算方法について述べた。Lifeact-TMは細胞膜の性質と、Lifeactのアクチンに結合する性質を合わせ持つため、1分子観察を行うと、細胞膜上を拡散しながら、アクチンに結合したときだけ拡散運動を止める。したがって、Lifeact-TMの一時停留を検出する解析方法を新たな方法で確立した。それとともに、Lifeact-TMを用いて、細胞膜に近接したアクチン構造を計測する解析方法を考案し、その有効性を示した。</p> <p>第4章では、第3章で開発したLifeact-TMの一時停留の検出法を用いた、細胞膜近接アクチン p1 クラスターの検出法を用いて、実際のNRK細胞で計測、解析を行い、アクチン p1 クラスターの66%は細胞膜から 3.5 nm 以内の位置にあることを示した。</p> <p>第5章では、Luoらによる先行研究の actin node に局在する分子である、myosin II と filamin A のアクチン p1 クラスターでの局在の有無を調べ、この先行研究との相違を調べた。これは第2章の結果と異なるように見えたが、その要因について、myosin II の機能に関連して議論した。さらに、第2～4章で見出したアクチン p1 クラスターの機能を調べるため、アクチン p1 クラスターへ局在する分子を4種（N-WASP, cortactin, Tks4, Tks5）同定し、1分子イメージングを用いて、N-WASP, Tks4, Tks5のアクチン p1 クラスターにおける滞在時間を調べた。これらの分子はポドソーム構成分子であったため、ポドソームのアクチン核形成に必須である Arp2/3 の関与を検討した。Arp2/3の阻害剤であるCK-666のアクチン p1 クラスターへの効果を調べた結</p>			

(論文審査の結果の要旨)

果、CK-666 添加後、20 秒以内に約 80%のアクチン p1 クラスターが消失することから、アクチン p1 クラスターでは、アクチンの重合、脱重合が秒のオーダーで頻繁に行われていることを明らかにした。

第 6 章では、本研究の結果のまとめと考察を行い、今後の展望について述べている。

本論文は、生細胞の細胞膜近傍アクチン構造を超解像蛍光顕微鏡法により観察し、アクチン線維が結節されたようなクラスター構造を発見したことに基づいて研究を発展させ、結節クラスター構造の動態、駆動機構、細胞内での局在と機能を明らかにする研究を纏めたものであり、以下のような研究結果を得ている。

(1) 超解像蛍光顕微鏡法を用いて、生きている NRK 細胞のアクチン動態を観察し、細胞膜近傍にアクチン線維が結節されたようなクラスター構造を発見した。結節クラスター構造は、細胞膜から 100 nm 以内のアクチン網上で、ランダム運動と一方向性の運動が混じり合った運動を行い、その運動は、アクチン網の多数の部位で、ミオシン II モーター分子がアクチン線維を引っ張っていること、かつ Arp2/3 によってアクチン線維の重合が常に起こることで誘起されることを見いだした。

(2) 細胞膜から約 3.5 nm 以内の距離に存在するアクチン線維を検出する方法を開発した。これは、Lifeact に膜貫通ペプチドを結合させた分子 (Lifeact-TM) を細胞膜に発現させ、1 分子観察する方法である。この方法により、結節クラスター構造の 66%が細胞膜から 3.5 nm 以内にあることが示された。

(3) 結節クラスター構造には、細胞移動時の基盤となるポドソームの構成タンパク質分子である Tks4, Tks5, cortactin, N-WASP が集積し、かつ、それらの分子は絶えず入れ替わっていて、1 分子レベルでの滞在時間は 0.5 秒未満と短いことが分かった。これは、アクチン結節構造が、細胞の接着と運動、ガン細胞の転移などにも関与する可能性を示し、さらに、それが構成分子の高速の交換で制御されている可能性を示すものである。

アクチンクラスターの構造・動態・分子組成は、細胞の様々な機能、例えば、ポドソーム形成、細胞運動、細胞の力学応答、ガン細胞の転移、などの研究において、常に考慮されるべきであり、また、アクチンクラスターは、細胞膜近傍に特に濃縮されていることから、エンドサイトシス、エクソサイトシス、シグナル変換、細胞分裂など、重要な細胞膜機能に関わっている可能性も示唆している。

本論文は、アクチンクラスター構造の発見からその動態解明、さらに新規開発プローブを利用したクラスター構造の分布、機能までを考察しており、学術上、実際上寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 30 年 2 月 16 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

尚、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、(平成 30 年 3 月 31 日までの間) 当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日: [平成 30 年 3 月 31 日以降](#)